

(19) Japan Patent Office (JP)

(12) Japanese Unexamined Patent
Application Publication (A)(11) Japanese Unexamined Patent
Application Publication Number

H8-116971

(43) Publication date May 14, 1996

(51) Int. Cl. ⁶	Identification symbols	JPO file number	F1	Technical indications
C12N 9/42				

Request for examination Not yet requested No. of claims 2 FD (Total of 4 pages)

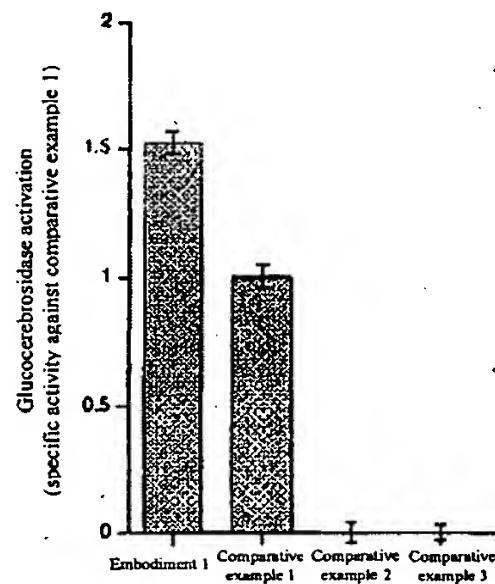
(21) Application number	H6-289301	(71) Applicant	000000952 Kanebo Trinity Holdings, Ltd. 5-17-4 Sumida, Sumida-ku, Tokyo
(22) Date of application	October 17, 1994	(72) Inventor	Mariko HARA 5-3-28 Kotobukicho, Odawara-shi, Kanagawa c/o Kanebo Ltd., Cosmetics Lab.
		(72) Inventor	Yoshikazu UCHIDA 5-3-28 Kotobukicho, Odawara-shi, Kanagawa c/o Kanebo Ltd., Cosmetics Lab.

(54) [Title of the Invention] Method for activating β -glucocerebrosidase

(57) [Abstract]

[Constitution] A method for activating β -glucocerebrosidase
in the epidermis with monoglycosyl sphingolipid.

[Benefits] Improvement for skin disorders.



[Scope of Patent Claims]

[Claim 1] A method for activating β -glucocerebrosidase characterized by using monoglycosyl sphingolipid.

[Claim 2] A method for activating β -glucocerebrosidase according to Claim 1, wherein monoglycosyl sphingolipid is β -galactosylceramide.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of Industrial Application] The present invention relates to a method for activating β -glucocerebrosidase in the epidermis. More specifically, it relates to a method for activating β -glucocerebrosidase in the epidermis by using monoglycosyl sphingolipid applied externally to the skin.

[0002]

[Prior Art and Problem to be Solved by the Invention] Skin disorders generally mean skin in a dry state in which separation phenomena is observed in the corneocytes. The occurrence of such skin disorders includes due to elution of intercorneocyte lipid such as cholesterol, ceramide and fatty acid, degeneration of corneocytes resulting from such as ultraviolet exposure and use of certain detergent, or hypoplastic of transparent barriers resulting from disruption of a proliferative and keratosis balance in the epidermal cells. With an aim to prevent or remedy the skin disorders, focusing on intercorneocyte lipid being an essential constituent for stratum corneum transparent barriers, studies have been made by supplying the constituent of intercorneocyte lipid or similar synthesized intercorneocyte lipid or by administering proliferative and keratosis regulators for corneocytes such as EGF (Epidermal Growth Factor).

[0003] Intercorneocyte lipid is lamellar granular biosynthesized in the cells of stratum spinosum, when stratum granulosum is released into the cells under the stratum corneum, extended, established a lamellar structure and dispersed into the cells. The lamellar granular consists of galactosylceramide, cholesterol, ceramide, phospholipids or the like, but, the intercorneocyte lipid contains almost no galactosylceramide. In other words, as a result of galactosylceramide in the lamellar granular being hydrolyzed by β -glucocerebrosidase, converted to ceramide, and the ceramide establishing a lamellar structure, it is considered to improve the formation of a stratum corneum transparent barrier as intercorneocyte lipid and have a function as a barrier for preventing skin disorders. For example, a patient with type 2 of Gaucher's disease that genetically lacks β -glucocerebrosidase completely was observed to have a pathological skin disorder as well as an

abnormality in the lamellar structure of the intercorneocyte lipid in histological study of the epidermis. Additionally, in transgenic mice which were artificially made to lack β -glucocerebrosidase, the correlation between an abnormality in the lamellar structure of the intercorneocyte lipid and skin disorders was found. Furthermore, experimentally, skin disorders and an abnormality in the lamellar structure of the intercorneocyte lipid due to inhibiting β -glucocerebrosidase have been observed. From these facts, it is said that for forming a normal stratum corneum transparent barrier, galactosylceramide is required to be hydrolyzed by β -glucocerebrosidase into ceramide. Therefore, activating β -glucocerebrosidase is considered to improve the formation of a stratum corneum transparent barrier and consequently improve skin disorders.

[0004] With such background, as an activator of β -glucocerebrosidase, SAP-2 that was found in the marmot pancreas and Ala or saposin C that was found in the human pancreas with Gaucher's disease are conventionally known.

[0005] However, because these activators are protein, applying them externally and activating β -glucocerebrosidase in the epidermis become a substantial problem with regard to transdermal absorbability and safety. In addition, it is extremely difficult to apply to the field by isolating these proteins.

[0006] From the above, a convenient method is required for activating β -glucocerebrosidase in the epidermis. Therefore, inventors in the present invention, as a result of keen examination on methods for resolving prior problems in view of abovementioned circumstances, discovered that β -glucocerebrosidase in the epidermis was able to be extremely easily activated with the following method and completed the present invention.

[0007]

[Means for Solving the Problem] Claim 1 of the present invention is a method for activating β -glucocerebrosidase characterized by using monoglycosyl sphingolipid. Additionally, Claim 2 of the present invention is a method for activating β -glucocerebrosidase according to Claim 1, wherein monoglycosyl sphingolipid is β -galactosylceramide.

[0008] Hereinafter, Constitution of the Invention is explained in detail. The method for activating β -glucocerebrosidase in the epidermis in the present invention is achieved by applying a skin drug for external use to the skin such as a blended monoglycosyl sphingolipid lotion. The monoglycosyl sphingolipid is β -galactosylceramide, β -glucosylceramide or other synthesized monoglycosyl sphingolipid.

[0009] The blending quantity of these monoglycosyl sphingolipid in the skin drug for external use is preferably 0.005 to 5.0% by weight based on the total quantity. With less blending quantity than the respective lower limit for them, sufficient effects are not obtained for the objective of the present invention, as well as with more blending quantity than the upper limit, effects commensurate with the increase are not obtained.

[0010] Activation of β -glucocerebrosidase in the epidermis is generally measured by using β -galactosylceramide radiolabeled as a substrate or 4-methylumbelliferyl β -glucopyranoside being a synthesized substrate with homogenate in the epidermis as a zymogene.

[0011] Hereinafter, the present invention is proven based on Embodiments and Comparative Examples.

[0012]

[Embodiments]

Embodiment 1 and Comparative Example 1

Producing a blended ethanol lotion and propylene glycol (7 : 3) containing 1.0% of β -galactosylceramide (derived from beef brain, Sigma-Aldrich Corporation, the U.S.), 50 μ l had been applied as a sample on the back skin of 5 hairless mice (10 weeks old) as a group once a day consecutively for 10 days. The experiment in which the concentration of β -galactosylceramide had been changed was meant as Embodiment 1. Additionally, a blended lotion of only propylene glycol and ethanol not containing β -galactosylceramide was also applied. This experiment was meant as Comparative Example 1.

[0013] Extracting the skin 24 hours after finally applying the sample in Embodiment 1 and Comparative Example 1, and removing the subcutaneous adipose tissue as quickly as possible, it was left in the 2N sodium bromide solution at 37°C for 2 hours. Subsequently, separating the epidermis with tweezers, homogenate was prepared by using polytron homogenizer (manufactured by Kinematica AG Company, Switzerland) in the phosphate buffered saline iced and diluted by 10 times.

[0014] β -glucocerebrosidase activation was measured according to the method of Miel and Vanderbrook (British Journal of Dermatology, vol. 95, pages 271 to 274, 1976). In other words, adding 500 μ l of buffer solution (pH 5.6) of 100 mM citric acid and 200 mM phosphate, and 500 μ l of buffer solution (pH 5.6) of 10 mM taurocholic acid, 100 mM citric acid and 200 mM phosphate to 50 μ l of homogenate, it was heated at 37°C for 10 minutes. Subsequently, adding 50 μ l of 0.5 mM 4-methylumbelliferyl- β -Dglucoside (Sigma-Aldrich Corporation, the U.S.), it was heated at 37°C for 60 minutes.

After that, adding 200 mM sodium carbonate-sodium hydrogen carbonate buffer (pH 10.5), the fluorescence intensity was measured with excitation wavelength 360 nm and absorption wavelength 450 nm. Based on the calibration curve created according to the fluorescence intensity of the standard 4-methylumbelliferone (Sigma-Aldrich Corporation, the U.S.), the enzyme activity was calculated.

[0015] Comparative Examples 2 and 3

In order to prove specificity of β -glucocerebrosidase activation, adding conduritol- β -epoxide (Sigma-Aldrich Corporation, the U.S.) known as a specific inhibitor of β -glucocerebrosidase at the final concentration 50 μ M, the enzyme activity was measured in the same manner as above. In other words, the enzyme sample of Embodiment 1 added conduritol- β -epoxide is Comparative Example 2, and the enzyme sample of Comparative Example 1 added conduritol- β -epoxide is Comparative Example 3.

[0016] Fig. 1 shows the measurement results for Embodiment 1 and Comparative Examples 1, 2 and 3 of β -glucocerebrosidase activation in the epidermis.

[0017] In these results, from the comparison between a lotion containing β -galactosylceramide (Embodiment 1) and a lotion not containing it (Comparative Example 1), significant differences between Embodiment 1 and Comparative Example 1 were observed at the risk ratio 1% or less, and it was found that β -galactosylceramide increased β -glucocerebrosidase activation in the epidermis. Furthermore, in the Comparative Example 2, 3 wherein conduritol- β -epoxide as a specific inhibitor of β -glucocerebrosidase was added, activation of enzyme was not much observed. Thus, this means that β -glucocerebrosidase activation was specifically measured in the present measurement condition.

[0018] Embodiments 2 and 3 and Comparative Examples 4 and 5

Producing a lotion with blended solution of propylene glycol and ethanol (7 : 3) containing 0.1% or 1.0% of β -galactosylceramide (derived from beef brain, Sigma-Aldrich Corporation, the U.S.) as the base agent, samples were made for Embodiments 2 and 3. Additionally, producing a blended lotion of only propylene glycol and ethanol not containing β -galactosylceramide, a sample was made for Comparative Example 4. Furthermore, producing a blended lotion of propylene glycol and ethanol (7 : 3) containing 1.0% of ceramide (Sigma-Aldrich Corporation, the U.S.), a sample was made for Comparative Example 4. These samples had been applied 30 μ l on the back skin of 5 hairless mice (9 weeks old) as a group once a day for 10 days.

Subsequently, β -galactosylceramide activation was investigated by the similar method of Embodiments 1 and 2. Fig. 2 shows the results. [0019] In these results, from the comparison between a lotion containing (Embodiments 2 and 3) and a lotion not containing (Comparative Example 4) β -galactosylceramide or a lotion containing ceramide (Comparative Example 5), significant differences between Embodiments 2, 3 and Comparative Examples 4 or 5 were observed at the risk ratio 0.1% or less, and it was found that β -galactosylceramide increased β -glucocerebrosidase activation in the epidermis but ceramide did not. Such a method for increasing β -glucocerebrosidase activation showed a new method for preventing and protecting from skin disorders.

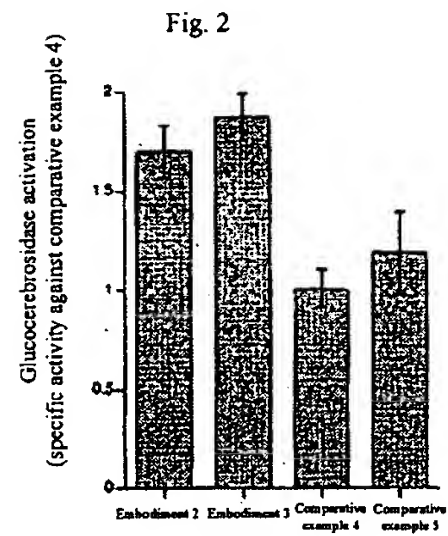
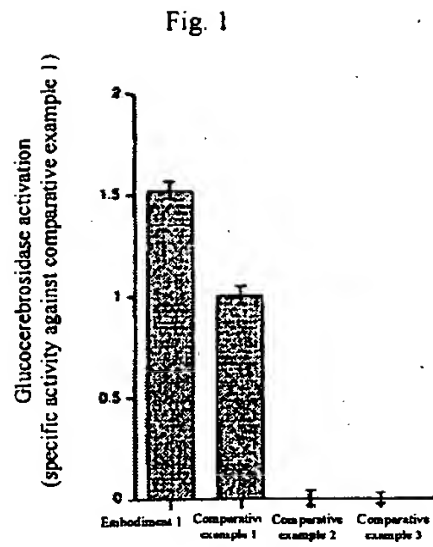
[0020]

[Effect of the Invention] As mentioned above, it is clearly shown that the present invention provides a convenient and excellent method for activating β -glucocerebrosidase in the epidermis. Also, the present invention makes possible a new way to prevent and be protected from skin disorders.

[Brief Description of the Drawings]

[Fig. 1] Fig. 1 shows the measurement results for β -glucocerebrosidase activation in Embodiment 1 and Comparative Examples 1, 2 and 3.

[Fig. 2] Fig. 2 shows the measurement results for β -glucocerebrosidase activation in Embodiments 2 and 3 and Comparative Examples 4 and 5.



(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-116971

(43)公開日 平成8年(1996)5月14日

(51)Int.Cl.

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

C12N 9/42

審査請求 未請求 請求項の数 2 FD (全 4 頁)

(21)出願番号

特願平6-289301

(22)出願日

平成6年(1994)10月27日

(71)出願人 000000952

鎭紡株式会社

東京都墨田区墨田五丁目17番4号

(72)発明者 原 真理子

神奈川県小田原市寿町5丁目3番28号 鎭

紡株式会社化粧品研究所内

(72)発明者 内田 良一

神奈川県小田原市寿町5丁目3番28号 鎭

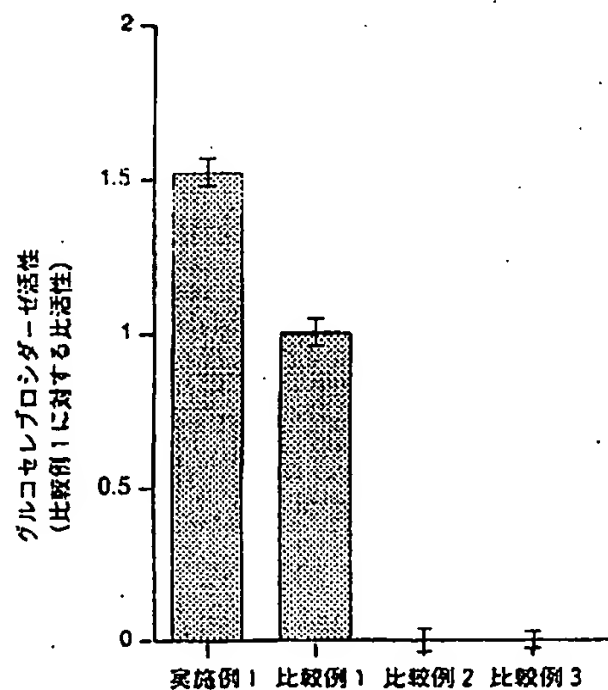
紡株式会社化粧品研究所内

(54)【発明の名称】 β -グルコセレブロシダーゼの活性化方法

(57)【要約】

【構成】表皮中の β -グルコセレブロシダーゼをモノグリコシルスフィンゴ脂質によって活性化させる方法。

【効果】荒肌の改善。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 モノグリコシルスフィンゴ脂質を用いることを特徴とする β -グルコセレブロシダーゼの活性化方法。

【請求項2】 モノグリコシルスフィンゴ脂質が β -ガラクトシルセラミドである請求項1記載の β -グルコセレブロシダーゼの活性化方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は表皮中の β -グルコセレブロシダーゼを活性化させる方法に関する。さらに詳しくは皮膚に外用されるモノグリコシルスフィンゴ脂質によって表皮中の β -グルコセレブロシダーゼを活性化させる方法に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】荒肌とは、一般に角質細胞の剥離現象が認められる乾燥状態の皮膚をいう。このような荒肌はコレステロール、セラミド、脂肪酸等の角質細胞間脂質の溶出、および紫外線、洗剤等に起因する角質細胞の変性や表皮細胞の増殖・角化バランスの崩壊による角質層透過バリアの形成不全等によって発生する。この荒肌を予防又は治療する目的で、角質細胞間脂質が角質層透過バリアに必須な成分であることに着目して、角質細胞間脂質成分又はそれに類似する合成の角質細胞間脂質成分を供給したり、EGF (Epidermal Growth Factor)等の表皮細胞の増殖・角化調節物質などを投与するなどの研究が行われている。

【0003】この角質層細胞間脂質は、有棘層と顆粒層の細胞で生合成された層板顆粒が、角質層直下で細胞間に放出され、伸展し、層板(ラメラ)構造をとり、細胞間に広がったものである。層板顆粒はグルコシルセラミド、コレステロール、セラミド、リン脂質等から構成されるが、角質層細胞間脂質にはグルコシルセラミドは殆ど含まれていない。すなわち、層板顆粒中のグルコシルセラミドは、 β -グルコセレブロシダーゼによって加水分解を受け、セラミドに変換され、このセラミドが、ラメラ構造をとる結果、角質層細胞間脂質として角質層透過バリアの形成を改善し、荒れ肌防御のバリアの働きを持つと考えられる。たとえば、 β -グルコセレブロシダーゼを遺伝的に完全に欠損したゴーシェ病タイプ2の疾患患者では病的荒れ肌が観察され、また、その表皮の組織学的研究によって角質層細胞間脂質のラメラ構造に異常が認められている。また、 β -グルコセレブロシダーゼを人為的に欠損させたトランスジェニックマウスでも角質層細胞間脂質のラメラ構造の異常と荒れ肌の相関が認められている。さらに、実験的にも、 β -グルコセレブロシダーゼを阻害すると荒れ肌と角質層細胞間脂質のラメラ構造の異常が観察されている。これらの諸事実より正常な角質層透過バリアの形成にはグルコシルセラミドが β -グルコセレブロシダーゼによってセラミドに加

水分解されることが必要であると言われている。したがって、 β -グルコセレブロシダーゼを活性化させることによって角質層透過バリアの形成が改善され、その結果として荒れ肌を改善することが可能であると考えられる。

【0004】このような背景にあって、 β -グルコセレブロシダーゼの活性化因子として、従来、モルモット脾臓から発見されたSAP-2やヒトゴーシェ病脾臓から発見されたA1aやサボシンCが知られている。

10 【0005】しかし、これら活性化因子はタンパク質であってこれらを外用して表皮の β -グルコセレブロシダーゼを活性化させることは、経皮吸収性や安全性の点で大きな問題がある。また、これらのタンパク質を単離して産業上利用することは極めて困難である。

20 【0006】以上のことから、表皮の β -グルコセレブロシダーゼを活性化させる簡便な方法が求められている。そこで、本発明者らは、上記の事情に鑑み従来の問題を解決する方法を鋭意研究した結果、後記方法によって意外にも表皮中の β -グルコセレブロシダーゼを極めて容易に活性化できることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0007】

【課題を解決するための手段】即ち、本発明の請求項1は、モノグリコシルスフィンゴ脂質を用いることを特徴とする β -グルコセレブロシダーゼの活性化方法である。また、本発明の請求項2は、モノグリコシルスフィンゴ脂質が β -ガラクトシルセラミドである請求項1記載の β -グルコセレブロシダーゼの活性化方法である。

30 【0008】以下、本発明の構成について詳述する。本発明の表皮中の β -グルコセレブロシダーゼを活性化する方法は、モノグリコシルスフィンゴ脂質が配合されたローション等の皮膚外用剤を皮膚に塗布することにより達成される。ここで、モノグリコシルスフィンゴ脂質は、 β -ガラクトシルセラミド、 β -グルコシルセラミド、その他の合成によるモノグリコシルスフィンゴ糖脂質である。

40 【0009】これらのモノグリコシルスフィンゴ脂質の皮膚外用剤中の配合量は、総量を基準として0.005～5.0重量%が好ましい。これら各々の下限未満の配合量では本発明の目的とする効果が十分でなく、一方、上限を越えてもその増加分に見合った効果の向上はない。

【0010】表皮の β -グルコセレブロシダーゼ活性は一般に、表皮のホモジネートを酵素原として、基質として、放射線標識した β -グルコシルセラミドや合成基質である4-メチルウンベリフェリル β -グルコピラノシドを用いて測定される。

【0011】以下、実施例および比較例に基づいて本発明を証明する。

50 【0012】

【実施例】

実施例1、比較例1

β -ガラクトシルセラミド（牛脳由来、シグマ社、米国）を1.0%含有するプロピレングリコール・エタノール混液（7:3）のローションを作成し、これを試料として1日に1回の頻度で1群5匹のヘアレスマウス（10週齢）の背部皮膚に50 μ l 10日間連続塗布した。 β -ガラクトシルセラミドの濃度を変えて行ったこれらの実験を実施例1とする。また、 β -ガラクトシルセラミドを含有しないプロピレングリコール・エタノール混液のみのローションを同様に塗布した。この実験を比較例1とする。

【0013】実施例1、比較例1における試料の最終塗布24時間後に皮膚を採取し、皮下脂肪組織を可及的に除去した後、37℃の2規定の異化ナトリウム水溶液中で2時間放置した。次いで、表皮をピンセットで剥離し、氷冷した10倍容のリン酸緩衝生理食塩水中でポリトロンホモジナイザー（キネマティカ社製、スイス）を用いてホモジネートを調製した。

【0014】 β -グルコセレブロシダーゼ活性は、ミエルとファンデルフルクの方法（ブリチッシュ・ジャーナル・オブ・デルマトロジー、95巻、頁271-274、1976年）に準じて測定した。すなわち、ホモジネート50 μ lに100mMクエン酸-200mMリン酸緩衝液（pH5.6）を500 μ lと10mMタウロコイル酸-100mMクエン酸-200mMリン酸緩衝液（pH5.6）500 μ lを加えて、37℃で10分間加温した。次いで0.5mMの4-メチルウンベリフェル β -Dグルコシド（シグマ社、米国）を50 μ l加えて、37℃で60分間加温した。その後、200mM炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液（pH10.5）を加え、励起波長360nm、吸収波長450nmで蛍光強度を測定した。標準品の4-メチルウンベリフェロン（シグマ社、米国）の蛍光強度より作成した検量線をもとに酵素活性を計算した。

【0015】比較例2、3

β -グルコセレブロシダーゼ活性の特異性を証明するために、 β -グルコセレブロシダーゼの特異的阻害剤として知られているコンジュリトール β -エポキシド（シグマ社、アメリカ合衆国）を最終濃度50 μ M加えて上記と同様にして酵素活性を測定した。すなわち、実施例1の酵素試料にコンジュリトール β -エポキシドを添加したものを比較例2、比較例1の酵素試料にコンジュリトール β -エポキシドを添加したものを比較例3とする。

【0016】表皮中の β -グルコセレブロシダーゼ活性の実施例1、比較例1、2、3における測定結果を図1に示す。

【0017】この結果において、 β -ガラクトシルセラミドを含有するローション（実施例1）とそれを含有しないローション（比較例1）との比較から、実施例1と比較例1の間に危険率1%以下で有意差が確認され、 β -ガラクトシルセラミドが表皮の β -グルコセレブロシダーゼ活性を高めることが分かった。また、 β -グルコセレブロシダーゼの特異的阻害剤であるコンジュリトール β -エポキシドを添加した比較例2、3においては酵素活性はほとんど検出されなかった。このことは、本測定条件で β -グルコセレブロシダーゼ活性は特異的に測定されていることを意味する。

【0018】実施例2、3、比較例4、5

0.1%又は1.0%の β -ガラクトシルセラミド（牛脳由来、シグマ社、米国）を含有するようにプロピレングリコール・エタノール混液（7:3）を基剤としたローションを作成し、実施例2、実施例3の試料とする。また、 β -ガラクトシルセラミドを含有しないプロピレングリコール・エタノール混液のみのローションを作成し、比較例4の試料とする。更に、1.0%のセラミド（シグマ社、米国）を含有するプロピレングリコール・エタノール混液（7:3）のローションを作成し、比較例4の試料とする。これらの試料を1日に1回の頻度で1群5匹のヘアレスラット（9週齢）の背部皮膚に300 μ l 10日間塗布した。以後、実施例1〜2と同様の方法によって β -グルコセレブロシダーゼ活性を調べた。その結果を図2に示す。

【0019】この結果において、 β -ガラクトシルセラミドを含有するローション（実施例2、3）とそれを含有しないローション（比較例4）又はセラミドを含有するローション（比較例5）との比較から、実施例2、実施例3と比較例4又は比較例5の間に危険率0.1%以下で有意差が確認され、 β -ガラクトシルセラミドが表皮の β -グルコセレブロシダーゼ活性を高めることと、セラミドはその活性を高めないことが分かった。このような β -グルコセレブロシダーゼ活性を高める方法によって荒れ肌の新たな予防と防御方法が示された。

【0020】

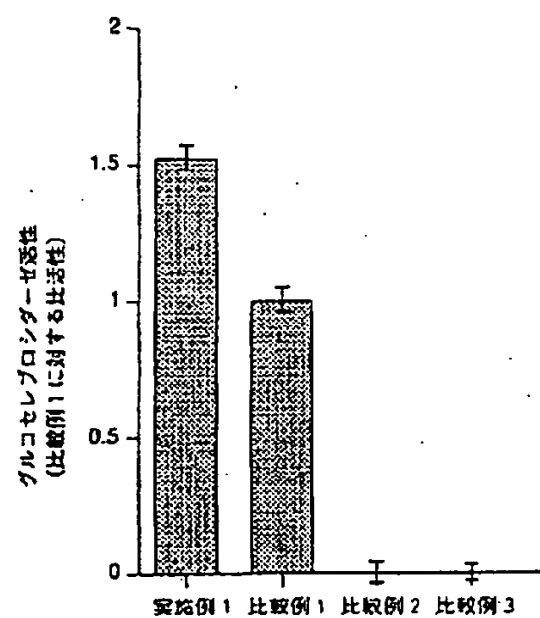
【発明の効果】以上記載のごとく、本発明は、表皮の β -グルコセレブロシダーゼを活性化する簡便で且つ優れた方法を提供することが明らかである。また、本方法によって荒れ肌の新たな予防と防御が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1、比較例1、2、3の β -グルコセレブロシダーゼ活性測定結果を示す。

【図2】実施例2、3、比較例4、5の β -グルコセレブロシダーゼ活性測定結果を示す。

【図1】



【図2】

